

## 別記様式第6号（第16条第3項、第25条第3項関係）

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士（薬科学）	氏 名	芝 晃 生
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
蛍光クエンチングを利用した脱リン酸化酵素活性の新規蛍光分析法の開発			
論文審査担当者			
主 査	教 授	松浪 勝義	印
審査委員	教 授	熊本 卓哉	
審査委員	准教授	山野 幸子	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>亜鉛(II)イオンを必須とするアルカリホスファターゼ (ALP) は、リン酸基転移反応を介して生体分子の機能制御を担う基質特異性の低い金属酵素である。ALPには臓器特異的なアイソザイム（肝臓、腎臓、小腸、骨など）があるため、肝機能障害や癌などが原因で血清中に放出されたALPは、それら疾患の臨床マーカーとして利用されている。臨床検査の指標として使用されている血中ALP濃度は、ALPアイソザイムすべての総量であるため、肝臓以外の臓器不全でも高値を示す場合がある。ALP活性測定法には、比色法、質量分析法、免疫学的分析法などがある。最も簡便な比色法では、クロモフォアで標識したリン酸エステル誘導体（人工基質）の加水分解反応をアルカリ性条件下で行い、生成物の特異的な可視吸収帯を検出する方法が汎用されている。一方、ヌクレオチドやリン酸化糖などの天然基質を使用し、生理pHの水溶液中でALP活性を測定する方法は数少ない。</p> <p>著者が所属する研究室では、ALPの活性中心をモデル化した低分子二核亜鉛錯体 (Phos-tag) がリン酸モノエステルイオン (<math>R\text{-OPo}_3^{2-}</math>) を捕捉し、化学的に安定な1:1複合体を形成することを見い出している。このPhos-tagの特性を利用して、様々なPhos-tag誘導体をリン酸化プロテオミクス分野で活用する研究を行っている。Phos-tagは、生理的pHの水溶液中でマイクロモル濃度のリン酸モノエステルイオンを捕捉することができる。これまでに、蛍光標識したPhos-tagとペプチド基質間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリアルタイムALP活性分析法と、天然基質であるリボフラビンリン酸とダブルシル基を有するPhos-tag誘導体間の蛍光クエンチング現象を利用したALP阻害剤プロファイリング法を報告している。本研究では、近接した状態で蛍光強度が減少するテトラメチルローダミンで標識したTAMRA誘導体 (TAMRA-Phos-tag) を用いて、ビスリン酸化タイプの天然基質（ピロリン酸）のALPによる加水分解反応の新規蛍光分析法を開発した。</p>			

TAMRA-Phos-tagとTAMRA-PEA（リン酸化エタノールアミン誘導体）の1:1混合物（2.5  $\mu\text{M}$ ）の蛍光強度は、それらの単独の蛍光強度の和の32%であり、複合体形成により近接したTAMRA間で顕著な蛍光クエンチング効果が得られた。その複合体にALPを添加した直後から蛍光強度はALP量依存的に増加し、消光率が半減するまでは擬一次反応速度論にしたがってTAMRA-PEAの脱リン酸化が進行した。その反応の初期速度とALP添加量は、ほぼ比例関係であった。この時間依存的かつALP量依存的な蛍光強度変化は、TAMRA/TAMRA蛍光クエンチングシステムがALP活性のリアルタイム蛍光分析に適用できることを示している。一方、ピロリン酸イオンを架橋配位子としたTAMRA-Phos-tag二量体システムの消光率は51%であった。阻害剤が存在しない場合のピロリン酸加水分解の初期反応速度を100%のALP活性としALP阻害剤の効果について検討した結果、ウシ小腸型ALPに対するバナジン酸イオンの50%阻害濃度0.18  $\mu\text{M}$ は、大腸菌型ALPの2.0  $\mu\text{M}$ と比較して約10分の1の値であることが明らかとなった。この結果は、TAMRA/TAMRA蛍光クエンチングシステムが、ALPアイソザイムに対する *in vitro* 阻害剤プロファイリング法として使用できることを示している。Phos-tag技術に基づいたTAMRA/TAMRA蛍光クエンチングシステムの長所は、TAMRA-Phos-tagは光安定性や化学的安定性が極めて高いこと、溶液状態で半年以上の室温保存でもほとんど分解しないこと、水溶液中のTAMRA-Phos-tagの量子収率（30%）は pH 5～9 の範囲で一定であり安定した可視光領域の蛍光分析が可能であること、汎用型の蛍光分析装置で短時間分析が可能であること、さらに、サンプリング操作を必要としないリアルタイム分析ができることである。

以上の結果から、本論文は、TAMRA/TAMRA蛍光クエンチングシステムが、ビスリン酸化タイプの天然型ALP基質の特性に関する研究やALPアイソザイム特異的阻害剤開発などの研究分野にブレイクスルーをもたらす研究手法であることを実証したものである。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博 士（薬科学）	氏 名	芝 晃 生												
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第4条第①・2項該当														
<p>論 文 題 目</p> <p>蛍光クエンチングを利用した脱リン酸化酵素活性の新規蛍光分析法の開発</p>															
<p>最終試験担当者</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">主 査</td> <td style="width: 33%;">教 授</td> <td style="width: 33%;">松浪 勝義</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">印</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>熊本 卓哉</td> <td></td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>准教授</td> <td>山野 幸子</td> <td></td> </tr> </table>				主 査	教 授	松浪 勝義	印	審査委員	教 授	熊本 卓哉		審査委員	准教授	山野 幸子	
主 査	教 授	松浪 勝義	印												
審査委員	教 授	熊本 卓哉													
審査委員	准教授	山野 幸子													
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判 定 合 格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月14日の第38回 広島大学医歯薬保健学研究科発表会（薬学系）及び平成31年1月10日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 アルカリフォスファターゼ（ALP）分析法の現状と問題点について</li> <li>2 蛍光法を用いた <i>in vitro</i> ALP活性測定 of 科学原理について</li> <li>3 天然基質を用いたALP活性測定法の科学的意義について</li> <li>4 人のALPアイソザイムの種類について</li> <li>5 血液中のALPの定量分析法の現状と問題点について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>															